製品コード 6181 ～ 6192

研究用

TaKaRa

# pLVSIN Vector シリーズ

説明書

本説明書では pLVSIN Vector と Lentiviral High Titer Packaging Mix（製品コード 6194）を用いるレンチウイルス発現系について、操作方法等を紹介しています。

v201509Da

# 目次


I. はじめに
A. 組換えレンチウイルスを用いた遺伝子の導入と発現 ..... 3
B. pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミド ..... 4
C. Lentiviral High Titer Packaging Mix ..... 5
D. バイオセーフティーについて ..... 6
II. その他必要な試薬等
A. レンチウイルスのパッケージングと力価測定に必要な細胞株 ..... 7
B. 試薬類 ..... 7
C. 哺乳動物細胞培養用の培地など ..... 7
D. 器具・装置 ..... 7
E. レンチウイルス力価測定 ..... 8
F. レンチウイルスの精製 ..... 8
G. レンチウイルスの濃縮 ..... 8
H. 遺伝子導入細胞の選択に用いる抗生物質 ..... 8
I. レンチウイルスによる遺伝子導入の促進に用いるポリブレン ..... 8
J. レンチウイルスによる遺伝子導入の促進に用いる RetroNectin® ..... 8
III. 目的遺伝子を搭載した pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドの構築 ..... 9
IV. 細胞培養ガイドライン
A. 一般的な細胞培養とレンチウイルスの情報 ..... 10
B. 凍結ストックからの Lenti-X™ 293T 細胞の培養 ..... 10
V. pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドからの組換えレンチウイルスの産生
プロトコール：Lenti-X 293T 細胞と Lentiviral High Titer Packaging Mix を用いた組換えレンチウイルスの産生 ..... 11
VI. 組換えレンチウイルスの力価測定
A. 各種力価測定方法 ..... 13
B. フローサイトメーターを用いた生物学的力価測定 ..... 14
VII. 組換えレンチウイルスを用いた標的細胞への遺伝子導入（トランスダクション）例 ..... 15
VIII. トラブルシューティングガイド ..... 17
IX. 関連製品 ..... 20
X. 参考文献 ..... 21
Appendix：補足のプロトコール
1. 安定な細胞株を選択するための抗生物質の力価測定 ..... 22
2. ウイルスの濃縮 ..... 22
XI. 使用上の注意 ..... 23

## I. はじめに

［**基本製品**］ SIN 型（自己不活性型）レンチウイルスベクタープラスミド

- pLVSIN-CMV Neo Vector（製品コード 6181）
- pLVSIN-CMV Hyg Vector（製品コード 6182）
- pLVSIN-CMV Pur Vector（製品コード 6183）
- pLVSIN-EF1 $\alpha$ Neo Vector（製品コード 6184）
- pLVSIN-EF1 $\alpha$ Hyg Vector（製品コード 6185）
- pLVSIN-EF1 $\alpha$ Pur Vector（製品コード 6186）

蛍光タンパク質搭載 SIN 型（自己不活性型）レンチウイルスベクタープラスミド

AcGFP1 融合発現ベクター

- pLVSIN-AcGFP1-N1 Vector（製品コード 6187）
- pLVSIN-AcGFP1-C1 Vector（製品コード 6188）
- pLVSIN-EF1 $\alpha$-AcGFP1-N1 Vector（製品コード 6189）
- pLVSIN-EF1 $\alpha$-AcGFP1-C1 Vector（製品コード 6190）

ZsGreen1 搭載 IRES 発現ベクター

- pLVSIN-IRES-ZsGreen1 Vector（製品コード 6191）
- pLVSIN-EF1 $\alpha$-IRES-ZsGreen1 Vector（製品コード 6192）

レンチウイルスパッケージングシステム

- Lentiviral High Titer Packaging Mix（製品コード 6194）

パッケージング細胞（一過性）

- Lenti-X 293T Cell Line（製品コード 632180）

### A. 組換えレンチウイルスを用いた遺伝子の導入と発現

組換えレンチウイルスは、初代培養細胞、幹細胞、神経細胞、非分裂細胞などを含めたほぼすべての哺乳類細胞に遺伝子導入可能なウイルスベクターです。

SIN (Self Inactivating) 型の pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドと Lentiviral High Titer Packaging Mix を用いる組換えレンチウイルス発現系では、目的遺伝子を挿入したベクタープラスミドを Lentiviral High Titer Packaging Mix とともに Lenti-X 293T Cell Line にコトランスフェクトすることにより、複製能のない組み換えビリオン（ウイルス粒子）を容易に作製できます。

Lentiviral High Titer Packaging Mix は最適化されたプラスミド混合物で、レンチウイルス転写物を感染性の VSV-G レンチウイルス粒子に高効率でパッケージングするために必要なタンパク質を最適な比率で発現します。VSV-G エンベロープタンパク質はほとんどのタイプの細胞に結合して遺伝子を導入できます。標的細胞へのウイルス感染（遺伝子導入）は、トランスフェクトされたパッケージング細胞より産生されるウイルス粒子を含んだ培養上清を用いて行います。

遺伝子導入された標的細胞では、構成発現の CMV プロモーターまたは EF1 $\alpha$ プロモーター制御下で目的遺伝子を発現します。本レンチウイルス発現系を利用することにより、広範囲の細胞種指向性を持ち、安全性が高い高力価の非増殖型ウイルスが得られ、優れた導入遺伝子発現を実現することができます。

pLVSIN Vector シリーズでは蛍光タンパク質搭載タイプのベクターとして、AcGFP1＊1 と目的遺伝子の融合発現を行うための N 末、C 末融合発現ベクター（製品コード 6187 ～ 6190）、あるいは目的遺伝子と ZsGreen1＊2 の IRES 配列によるバイシストロニックな遺伝子発現を行うための IRES ベクター（製品コード 6191/6192）を用意しています。
蛍光タンパク質融合発現ベクターあるいは IRES ベクターを使用した共発現により、遺伝子導入効率や目的遺伝子の細胞内発現と局在を容易に確認することができます。

＊1： AcGFP1 タンパク質は、ヒトコドンに最適化された、オワンクラゲの一種 *Aequorea coerulescens* 由来の緑色蛍光タンパク質です。
＊2： ZsGreen1 は、ヒトコドンに最適化された、サンゴの一種 *Zoanthus sp.* 由来の緑色蛍光タンパク質です。

表 1. 蛍光タンパク質の特性

| | 蛍光タンパク質 | |
|---|---|---|
| | AcGFP1 | ZsGreen1 |
| 励起極大波長 (nm) | 475 | 493 |
| 蛍光極大波長 (nm) | 505 | 505 |
| 相対的な蛍光強度 | 明るい | 極めて明るい |
| 輝度＊（相対蛍光強度） | 26,650 | 39,130 |
| 構造 | 単量体 | 四量体 |
| レポーターとしての有用性 | 優れている | 非常に優れている |
| 融合タンパク質としての有用性 | 非常に優れている | 使用可能 |

＊：輝度＝モル吸光係数（$cm^{-1}M^{-1}$）× 量子効率

**B. pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミド**

pLVSIN Vector は SIN 型のレンチウイルスベクタープラスミドで、HIV-1 LTR（5′LTR および 3′ LTR/ Δ U3）とレンチウイルスパッケージングシグナル（Ψ）とともに、導入遺伝子の発現やウイルス力価、ベクター全体の機能を向上させる各種配列を含んでいます。

- **WPRE**（ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント）：
  WPRE はポリ A 部位のリードスルーを防ぎ、RNA のプロセッシングと成熟を促進し、RNA の核外への輸送を増大させます（Zufferey *et al*. 1999; Higashimoto *et al*., 2007）。この WPRE は、パッケージング細胞内のウイルスゲノム転写物に作用してベクターパッケージングを促進し、ウイルス力価を増大させます。さらにベクターの内部プロモーターによって産生される mRNA の成熟を促進するため、遺伝子導入された標的細胞内の目的遺伝子の発現を促進します。
- **cPPT/CTS**（セントラルポリプリン配列／セントラルターミネーション配列）：
  cPPT と CTS によって形成される “DNA フラップ ” は、標的細胞への感染過程においてウイルスゲノムの核内への輸送を促進します。そのため、cPPT/CTS エレメントはベクターのゲノムへの組込みと遺伝子導入効率を向上させます（Zennou *et al*., 2000）。
- **RRE**（Rev 応答エレメント）：
  スプライシングされていないウイルスゲノム RNA の核外への輸送を促進することで、ウイルス力価を向上させます（Cochrane, *et al*., 1990）。

**注：** pLVSIN Vector シリーズのうち、製品コード 6181 ～ 6186 および 6187 ～ 6190（AcGFP1 搭載）のベクタープラスミドは薬剤耐性マーカー（Neo$^r$、Hyg$^r$、または Puro$^r$）を搭載していますが、製品コード 6191、6192（ZsGreen1 搭載）は薬剤耐性マーカーを含みませんのでご注意ください。

### C. Lentiviral High Titer Packaging Mix

Lentiviral High Titer Packaging Mix は、レンチウイルスベクター調製に必要なコンポーネントを発現するプラスミドを最適な比率で混合し、ウイルスパッケージングに必要なコンポーネントを最適な比率で発現するよう設計することで、高力価のレンチウイルスベクターを得ることを可能にした製品です。目的遺伝子を挿入した pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドと Packaging Mix を Lenti-X 293T 細胞にコトランスフェクトすることで、Packaging Mix より HIV-1 由来の Gag、Pol、Tat、Rev のレンチウイルスタンパク質と、VSV-G エンベロープタンパク質が一過性に発現されます。そして、pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドから転写された組換えウイルス RNA は完全なウイルス粒子の中に取り込まれます（図 1）。この最適化された Packaging Mix と Lenti-X 293T 細胞、さらに高効率トランスフェクション試薬 *Trans*IT-293 Transfection Reagent（製品コード MIR2700）の組み合わせにより、高いウイルス力価を有するレンチウイルスベクター液を取得することができ、多くの場合、取得したレンチウイルスベクター液を濃縮することなく、直接、標的細胞の感染に使用できます。

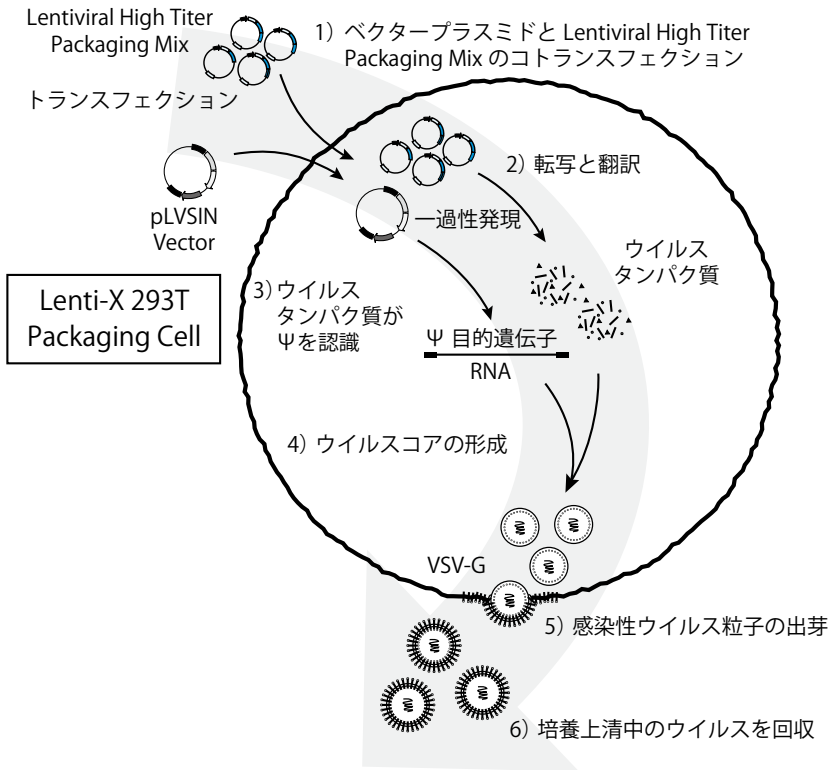


**図 1. Lentiviral High Titer Packaging Mix と Lenti-X 293T 細胞を用いたレンチウイルスの産生**

Lentiviral High Titer Packaging Mix と目的遺伝子を挿入した pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドをコトランスフェクトする（ステップ 1）と、対応する組換えレンチウイルスゲノム RNA 転写物とウイルスパッケージングタンパク質が産生される（ステップ 2）。組換えウイルス RNA ゲノム上のパッケージング配列（Ψ）がパッケージングタンパク質に認識されると（ステップ 3）、組換えウイルス RNA ゲノムがパッケージングタンパク質に取り込まれてウイルスコアが形成され、コアが細胞膜に輸送される（ステップ 4）。その場所で、コアは VSV-G エンベロープタンパク質を含む細胞膜によって包まれる。成熟した感染性のビリオン（ウイルス粒子）が細胞から出芽し（ステップ 5）、培地中に放出される。培地からウイルス粒子を回収する（ステップ 6）。

ウイルス粒子は感染力があるが、標的細胞内での複製・増殖に必要ないくつかの遺伝子を欠いている。ウイルスタンパク質を発現するのに必要なプラスミドを複数用いているため、頻度の低い組換えが何度も起こらないと、複製能をもつウイルスは生成しない。その意味で、この方法は非常に安全なウイルス生産法といえる。

## D. バイオセーフティーについて

pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドは、本製品により調製した遺伝子組換えレンチウイルスと野生型 Human immunodeficiency virus 1 型（HIV-1）との予期せぬ重複感染などの特殊な条件下においても、自立的な増殖力及び感染力を保持せず、かつ、哺乳動物などに対する病原性を獲得することがないように、カルタヘナ法令 研究開発二種省令（平成 16 年文部科学・環境省令第 1 号）および告示（平成 16 年文科省告示第 7 号）における「HIV-1 の増殖力等欠損株」（実験分類クラス 2）に要求される以下の 3 つの要件をすべて満たした、安全性に十分配慮した設計となっています。

1. HIV-1 由来の調節遺伝子およびアクセサリー遺伝子（*nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*）および制御遺伝子（*tat*, *rev*）のすべての機能を欠損している。
2. 構造遺伝子（*gag*, *pol*, *env*）の固有部分をすべて欠損している。
3. プロウイルスにおいて LTR のプロモーター活性を持たないよう、3'LTR の U3 領域にあるエンハンサー配列とプロモーター配列を欠損している。

「HIV-1 の増殖力等欠損株」としての要件は、平成 17 年 10 月 14 日付 科学技術・学術審議会 生命倫理・安全部会 遺伝子組換え技術等専門委員会によるポジションペーパー「Human immunodeficiency virus（HIV）1 型の増殖力等欠損株の解釈について」に示されています。従って、pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドに、哺乳動物等に対する病原性もしくは伝達性に関係しないクラス 2 以下の供与核酸（発現目的の遺伝子）をクローニングし、Lentiviral High Titer Packaging Mix を用いて組換えレンチウイルスのパッケージング形成を行う遺伝子組換え実験は機関実験（P2）とすることが可能です。
Lentiviral High Titer Packaging Mix は、第 3 世代のパッケージングシステムとして、RCL（replication-competent lentivirus）の出現の可能性を最小化するための安全な設計が行われています。

**注：**本ベクター製品を改変した組換えレンチウイルスを利用される場合、改変内容によっては、実験分類がクラス 3 以上に分類される場合があります。こうした遺伝子組換え実験を行う場合は、事前に文部科学大臣による拡散防止措置の確認（承認）が必要となりますのでご注意ください。

製品使用の際には「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（通称カルタヘナ法）」と関連政省令、告示および所属機関内の安全委員会の規定に従い、執るべき拡散防止措置施設の下で実験を開始してください。組換えウイルスの保管、運搬についても法令を順守してください。研究開発二種省令の詳細は文部科学省研究振興局ライフサイエンス課のホームページをご確認ください。
http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html#kumikae

## II. その他必要な試薬等

### A. レンチウイルスのパッケージングと力価測定に必要な細胞株

- **Lenti-X 293T Cell Line（製品コード 632180）**
  ウイルス生産に最適化された HEK 293T 由来細胞株であり、高いトランスフェクション効率を示します（*Clontechniques*, October 2008）。高力価の感染性レンチウイルスを得るために、Lentiviral High Titer Packaging Mix と目的遺伝子を挿入した pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドを *Trans*IT-293 Transfection Reagent を用いて Lenti-X 293T 細胞にコトランスフェクトします。トランスフェクトされた細胞は、高力価の組換えレンチウイルスを一過性に生産します。本細胞の代わりに HEK 293T 細胞株、例えば American Type Culture Collection（ATCC No. CRL-121）の HEK 293T/17 細胞株も使用できます。HEK293T 株にはいくつかの系統が市販されていますが、高いトランスフェクション効率の実績がある系統の使用をお勧めします。

- **HT-1080 cell line**
  American Type Culture Collection HT-1080（ATCC No. CCL-121）（推奨）。この細胞株は組換えレンチウイルスにより容易に遺伝子導入されるため、しばしばレンチウイルスの力価測定に用いられます。

### B. 試薬類

- 下記のうちいずれかのトランスフェクション試薬＊1
  a. *Trans*IT-293 Transfection Reagent（製品コード MIR2704）
  b. CalPhos™ Mammalian Transfection Kit（製品コード 631312）
- 蛍光タンパク質搭載 SIN 型レンチウイルスベクタープラスミド（ポジティブコントロール用：製品コード 6187 ～ 6190）＊2

＊ 1：a は安定して高力価のレンチウイルスを取得するのに適しており、b は比較的安価にトランスフェクションを行うことができます。本製品を使用して高力価のレンチウイルスを取得するには *Trans*IT-293 Transfection Reagent の使用を強く推奨します。

＊ 2：蛍光タンパク質である AcGFP1 を発現するレンチウイルスベクタープラスミドであり、トランスフェクション効率の確認や、調製したレンチウイルスの生物学的力価を確認するためのポジティブコントロールとして使用するのに便利です。

### C. 哺乳動物細胞培養用の培地など

- Lenti-X 293T Cell Line（製品コード 632180）及び HT-1080 cell line 培養培地
  高濃度グルコース（4.5 g/L）を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）に 10% FBS を添加して使用します。
- 標的細胞の培養培地および添加物
- Penicillin/Streptomycin solution（10,000 units/ml Penicillin G sodium salt, 10,000 μg/ml Streptomycin sulfate）
- Trypsin-EDTA
- Dulbecco's phosphate buffered saline（DPBS）
- 細胞凍結保存液（セルバンカーシリーズなど）

### D. 器具・装置

- 細胞培養用プレート（100 mm、12 ウェルなど）、フラスコ
- 滅菌チューブ（1.5 ml、2.0 ml、15 ml など）およびウイルス液凍結保存用バイアル
- ウイルス液濾過用 0.45 μm フィルター
  注：ろ過を行う場合は、タンパク質の吸着力が弱い PolyVinylidene DiFluoride（PVDF）、酢酸セルロースまたは polyethersulfone（PES）フィルターを用います。ニトロセルロースはレンチウイルスのエンベロープ上の表面タンパク質と結合してウイルスを破壊するため、使用しないでください。
- 細胞培養に必要な一般的器具及び設備

### E. レンチウイルス力価測定

正確で再現性のある遺伝子導入のために、レンチウイルスストック液の力価測定を強く推奨します。Lenti-X qRT-PCR Titration Kit（製品コード 631235）は、qRT-PCR を利用した迅速・簡便な力価測定キットです（*Clontechniques*, January 2008; Quinn *et al*., 1997）。本キットでは SYBR® Green I 検出リアルタイム PCR によりウイルス RNA ゲノムの存在量（RNA タイター）を調べることで、ウイルスストック液の力価を約 4 時間で測定できます。

Lenti-X p24 Rapid Titer Kit（製品コード 632200）では、ELISA 法を用いてウイルス上清中の p24 キャプシドタンパク質の量を測定します。測定した p24 キャプシドタンパク質量はウイルス力価と相関します。

また、Lenti-X GoStix™（製品コード 631243/631244）を用いると、ウイルス上清 20 µl を使用して最短 30 秒（～ 10 分）でレンチウイルス p24 を検出してウイルス力価を簡易判定できます。ウイルス上清を回収するか、まだ培養を続けるかを判断するために有用です。

### F. レンチウイルスの精製

ウイルスを精製することで、遺伝子導入実験に悪影響を及ぼすおそれがある細胞夾雑物を除去することができます。Lenti-X Maxi Purification Kit（製品コード 631233/631234）は、クルードな上清から高純度レンチウイルスを精製するためのキットで、自然落下カラムを用いたプロトコールにより、インタクトで機能的なレンチウイルスを簡単、迅速、高効率で得ることができます。

### G. レンチウイルスの濃縮

Lenti-X Concentrator（製品コード 631231/631232）を用いると、超遠心を行わずにウイルス力価を 100 倍まで濃縮できます。濃縮されたレンチウイルスは高い MOI で標的細胞に感染できるため、さらにレンチウイルスを調製する必要がありません。

（詳細は Appendix をご参照ください。）

### H. 遺伝子導入細胞の選択に用いる抗生物質

各耐性遺伝子をもつ LVSIN レンチウイルスによって遺伝子導入された標的細胞の薬剤選択、および対応するウイルスストック液の薬剤選択による力価測定には、G418（製品コード 631307/631308）、Hygromycin B（製品コード 631309）、Puromycin（製品コード 631305/631306）をそれぞれ使用します。これらの抗生物質を使用する前に、Appendix に記載している方法に従って使用する細胞株に最適な選択濃度を求めておきます。

### I. レンチウイルスによる遺伝子導入の促進に用いるポリブレン

組換えレンチウイルスによる遺伝子導入の促進には、ポリブレン（Polybrene：hexadimethrine bromide; Sigma-Aldrich, No. H9268）の添加が有効です。ポリブレンはポリカチオンで、ウイルスと細胞膜の電荷的反発を減少させます。標的細胞に対するポリブレンの最適濃度（感染力が最大で毒性が最少となる濃度）を 2 ～ 12 µg/ml の濃度範囲で実験的に求めておく必要があります。ポリブレンに特に悪影響を受ける細胞や造血系細胞の場合は RetroNectin 試薬の使用を検討してください。

### J. レンチウイルスによる遺伝子導入の促進に用いる RetroNectin

RetroNectin (Recombinant Human Fibronectin Fragment)（製品コード T100A/B）は組換えフィブロネクチン断片（CH-296）で、レトロウイルスやレンチウイルスによる遺伝子導入効率を大きく向上させることができます（*Clontechniques*, October 2008）。RetroNectin は、組織培養プレート（ノントリートメント）にコーティングすることで、ウイルスと細胞の両方が結合する基質（substratum）となります。この基質にウイルスと細胞が同時に接着することにより、細胞とウイルスの接触が増大し、遺伝子導入が促進されます。RetroNectin は、特に浮遊細胞（リンパ球やリンパ球細胞株など）や遺伝子導入が困難な細胞（造血幹細胞など）、あるいはポリブレンに特に弱い細胞に有用です。

## III. 目的遺伝子を搭載した pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドの構築

1. プラスミド DNA を増幅する場合には、大腸菌宿主株、例えば *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells（製品コード 9028）などに導入し、市販のプラスミド精製キットを用いて精製する。

2. 標準的なクローニング技術を用いて、目的の遺伝子コード配列を pLVSIN Vector のマルチクローニングサイトに挿入する。また、In-Fusion® HD Cloning Kit（製品コード 639648 等）も使用できる。このキットを用いると、PCR 産物をベクターの任意の位置に容易にディレクショナルクローニング可能である。

   注 1： Multi Cloning Site (MCS) への目的遺伝子配列（cDNA あるいは遺伝子断片）挿入は、以下の点に注意して行ってください。

   【蛍光タンパク質を搭載しない SIN 型 Vecor】
   目的遺伝子配列（cDNA あるいは遺伝子断片）は ATG 開始コドンと終始コドンを含む配列で挿入します。

   【N1 Vecor】
   N1 ベクターは、MCS が蛍光タンパク質 AcGFP1 の上流に位置しており、MCS に挿入した目的遺伝子は AcGFP1 の N 末端側に融合されて発現されます。目的遺伝子と AcGFP1 との融合タンパク質を発現させるためには、目的遺伝子配列は AcGFP1 コーディング配列とフレームを一致させ、かつ、終始コドンを生じない形で MCS に挿入する必要があります。また、目的遺伝子配列の N 末端側には必ず開始コドン (ATG) を付加してください。

   【C1 Vector】
   C1 ベクターは、MCS が蛍光タンパク質 AcGFP1 の下流に位置しており、MCS に挿入した目的遺伝子は AcGFP1 の C 末端側に融合され発現されます。目的遺伝子と AcGFP1 との融合タンパク質を発現させるためには、目的遺伝子配列は AcGFP1 コーディング配列とフレームを一致させた形で MCS に挿入する必要があります。融合タンパク質は、AcGFP1 由来の開始コドン (ATG) より翻訳されるため、目的遺伝子配列への開始コドンの付加は不要です。また、MCS 下流に終始コドンがあらかじめ挿入されているため、目的遺伝子 C 末端側への終始コドンの付加は通常必要ありません（※）。
   ※ 目的遺伝子 C 末端側へ終始コドンを付加しない場合、MCS 由来のアミノ酸配列が目的遺伝子の C 末端側に付加されます。こうしたアミノ酸配列の付加が問題となる場合は、目的遺伝子配列 C 末端側に終始コドンを付加した形で MCS に挿入することをお勧めします。

   【IRES Vector】
   MCS に挿入した目的遺伝子は IRES 配列を介して ZsGreen1 遺伝子と同一の mRNA として転写され、その後、別々のタンパク質として翻訳されます。したがって、目的遺伝子配列には、開始コドン (ATG) および終始コドンを付加する必要があります。
   IRES 前の MCS に挿入する遺伝子の長さは、0.7 ～ 1.2 kb が最適です。また、IRES 配列前の MCS に翻訳される ORF をクローニングしていない状態では、蛍光タンパク質の発現が低くなり、蛍光顕微鏡による検出が難しい場合があります。

   注 2： Kozak consensus ribosome binding site (Kozak, 1987) を付加すると発現レベルが向上する可能性があります。一方、遺伝子断片あるいは cDNA にポリ A シグナルは不要です。このような配列をウイルス LTR 間に挿入すると、ウイルスゲノムの転写過程で未成熟の分解とポリ A 化が起こり、機能的な組換えビリオン（ウイルス粒子）の産生が妨げられることがあります（Coffin *et al.*,1997）。

3. パッケージング細胞のトランスフェクションに適したグレードのプラスミド DNA 調製を行う。
   （参考）NucleoBond Xtra Midi/Maxi（製品コード 740410.10、740414.10 など）の使用を推奨します。また、同キットを用いた場合でも、取得したプラスミド DNA を 14,000 × *g* で 10 分間遠心し、その上清をプラスミド DNA 溶液として回収することで、トランスフェクションに適した、さらに高純度のプラスミド DNA 溶液の取得が可能です。

## IV. 細胞培養ガイドライン

### A. 一般的な細胞培養とレンチウイルスの情報

本説明書中のプロトコールは、レンチウイルスの使用と哺乳動物細胞の培養技術の一般的なガイドラインです。滅菌技術を用いる細胞培養に関するすべてのステップは、レンチウイルスの使用を承認された安全キャビネットの中で行ってください。レンチウイルス、レトロウイルス、哺乳動物細胞培養に関する情報をさらに知りたい方には、次の書籍をお勧めします。

- Retroviruses, ed. by J. M. Coffin, S. H. Hughes & H. E. Varmus (1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY)
- *Culture of Animal Cells*, 5th Edition, ed. by R. I. Freshney (2005, Wiley-Liss, NY)
- *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. by F. M. Ausubel, *et al*. (1995, Wiley & Sons)

### B. 凍結ストックからの Lenti-X 293T 細胞の培養

凍結細胞は入手後すぐに液体窒素中で保存してください。液体窒素保存ができない場合は、直ちに培養を開始する必要があります。培養開始が遅れると、細胞の生存率が減少する可能性があります。
HEK 293 細胞由来の細胞株の場合、凍結ストックの効率的な培養にはコラーゲンコートしたプレートあるいはフラスコをお勧めします。また、本細胞は接着能が弱いため、回復後の細胞もコラーゲンコートした容器で培養することをお勧めします。

浸透圧ショックを防ぎ、細胞の生存率を最大にするために次の手順で凍結ストックからの培養を行ってください。

1. 25 ml の完全培地を 37℃のウォーターバスで温める。培地組成については II. C を参照。
2. 細胞バイアルを 37℃のウォーターバス中で穏やかに撹拌して融解する。融解後直ちにバイアルの外側を 70%エタノールで拭う。これ以降の操作はすべて、厳密な無菌条件下で安全キャビネットの中で行う。バイアルのキャップをゆっくり開け、ピペットを用いて内容物を、あらかじめ温めておいた 1 ml 完全培地を含む 15 ml コニカル遠心チューブに移した後、穏やかに撹拌する。
3. あらかじめ温めておいた 4 ml の新鮮な完全培地をさらにチューブにゆっくり加え、穏やかに混合する。
4. あらかじめ温めておいた 5 ml の完全培地をさらにチューブに加え、穏やかに混合する。100 × *g* で 5 分間遠心した後、上清を吸引除去し、適当量の完全培地を加えて細胞を穏やかに懸濁する。（この操作は凍結保護材を除去するために有効である。弱い細胞膜を傷つけないように、必ず細胞を穏やかに取扱わなければならない。）
5. 細胞懸濁液を完全に混合した後、適切な培養容器に加える。ディッシュ／フラスコを穏やかに揺り動かし（あるいは回し）、細胞を生育表面に均一に分散させる。湿潤な 37℃の $CO_2$ インキュベーター（適切な $CO_2$ 濃度は 5 ～ 10%）に入れ、24 時間培養する。
6. 翌日、細胞を顕微鏡で観察する。細胞が十分に接着し、コンフルエントな状態になっていることを確認して、次のステップに進む。大部分の細胞が十分に接着していない場合は、さらに 24 時間培養を続ける。HEK 293 由来細胞株を新たに融解して培養した場合、細胞が完全に接着するのに、48 時間程度かかることもある。
7. 培養がスタートして細胞が正常に増殖したら、少量ずつ分注して凍結ストックを調製する。細胞の凍結プロトコールについては、Lenti-X 293T Cell Line Protocol-at-a-Glance（PT4058-2）を参照。

## V. pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドからの組換えレンチウイルスの産生

### プロトコール： Lenti-X 293T 細胞と Lentiviral High Titer Packaging Mix を用いた組換えレンチウイルスの産生

Lentiviral High Titer Packaging Mix を用いて高力価のレンチウイルスを得るには、Lenti-X293T 細胞を使用し、以下のプロトコールに厳密に従う必要があります。特に、(1) 培養サイズと容量、(2) DNA の量とトランスフェクションに適した品質、(3) インキュベーション時間は厳守してください。

以下のプロトコールは、pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドと Lentiviral High Titer Packaging Mix を用いて、Lenti-X293T 細胞へ導入してウイルス産生を行うことを前提に最適化されています。

すべてのステップは安全キャビネットの中で行ってください。レンチウイルスの取扱いには、レンチウイルスの使用を承認されたバイオセーフティーレベルの設備が必要です。HIV-1 由来ベクターでパッケージングされた組換えレンチウイルスはヒト細胞への感染力があります。適切な安全措置を講じてください。

#### V-1. Lenti-X 293T 細胞播種

Lenti-X 293T 細胞を 100 mm 細胞培養用ディッシュに 5.0 × $10^6$ cells/10 ml/dish で播種*1 し、5% $CO_2$ インキュベーター内で 37℃にて一晩培養する。
培地には 10% FBS 含有 DMEM 培地を使用する。1% Penicillin-Streptomycin を添加した DMEM 培地も使用できる。

＊1：トランスフェクション試薬に CalPhos Mammalian Transfection Kit（製品コード 631312）を使用する場合は 2.5 × $10^6$ cells/10 ml/dish で播種する。

#### V-2. トランスフェクション（細胞播種翌日）

pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドと Lentiviral High Titer Packaging Mix を Lenti-X 293T 細胞へトランスフェクトする。
トランスフェクション試薬は以下の 2 種類を推奨。

a. *Trans*IT-293 Transfection Reagent（製品コード MIR2704）
b. CalPhos Mammalian Transfection Kit（製品コード 631312）

注：a は安定して高力価のレンチウイルスを取得するのに適しており、b は比較的安価にトランスフェクションを行うことができます。本製品を使用して高力価のレンチウイルスを取得するには *Trans*IT-293 Transfection Reagent の使用を強く推奨します。

以下に、それぞれの試薬を使用した場合のトランスフェクションプロトコールを紹介します。

**a. *Trans*IT-293 Transfection Reagent（製品コード MIR2704）を使用する場合**
（手順の詳細は *Trans*IT-293 Transfection Reagent の取扱説明書をご参照ください。）

1. *Trans*IT-293 Transfection Reagent を室温に戻し、使用前にボルテックスで混合する。
2. 2.0 ml チューブを使用し、以下の混合比で無血清の DMEM とプラスミド DNA を混合し、穏やかにピペッティングして完全に混合する。

| | |
|---|---|
| Lentiviral High Titer Packaging Mix | 7 µl |
| 0.5 µg/µl pLVSIN Vector | 11 µl |
| 無血清 DMEM | 1,500 µl |
| Total | 1,518 µl |

3. 2. で作製した混合液に 45 μl の *Trans*IT-293 Transfection Reagent を添加し、穏やかにピペッティングして混合し、15 ～ 30 分、室温で静置する。
4. 前日に播種した Lenti-X 293T 細胞に 3. の混合液をすべて滴下し、5 % $CO_2$ インキュベーター内で 37℃にて培養を続ける。

**b. CalPhos Mammalian Transfection Kit（製品コード 631312）を使用する場合**

より高力価なレンチウイルスを取得するため、以下のプロトコールは CalPhos Mammalian Transfection Kit に添付のプロトコールを、本キットへの使用に合わせて一部改良しています。

1. 2 × HEPES-Buffered Saline、2 M Calcium Solution、Sterile $H_2O$ を室温に戻しておく。
2. 以下の混合比でプラスミド DNA とカルシウム溶液を 15 ml チューブ中で混合する。

| | |
|---|---|
| Lentiviral High Titer Packaging Mix | 7 μl |
| 0.5 μg/μl pLVSIN Vector | 11 μl |
| 2 M Calcium Solution | 87 μl |
| Sterile $H_2O$ | 595 μl |
| Total | 700 μl |

3. 2 × HEPES-Buffered Saline が室温に戻っていることを確認し、2. の総量と等量（700 μl）の 2 × HEPES-Buffered Saline を添加し、チューブにフタをして上下に 15 回激しく振って混和する。
4. 5 分間室温にて静置する。

   注：静置時間は 5 分間を厳守し、5 分経過後は速やかに次の工程に進んでください。静置時間が長くなるとリン酸カルシウム -DNA の結晶が大きくなりすぎて、トランスフェクション効率が低下することがあります。

5. 前日に播種した Lenti-X 293T 細胞に 4. の混合液を滴下し、5% $CO_2$ インキュベーター内で 37℃にて培養を続ける。

### V-3. 培地交換

トランスフェクションから約 24 時間後に新しい 10% FBS 含有 DMEM 10 ml に交換する。1% Penicillin-Streptomycin を添加した DMEM 培地も使用できる。

注：CalPhos Mammalian Transfection Kit を使用してトランスフェクションを実施した場合は、顕微鏡観察により、リン酸カルシウムの結晶を確認することができます。

### V-4. レンチウイルス液の回収

1. トランスフェクションから約 48 時間後にレンチウイルスを含む培養上清を回収する。
2. 回収した培養上清ををを 0.45 μm フィルターでろ過し、これをレンチウイルス液とする。

調製したレンチウイルス液は、直ちに使用しない場合、－ 80℃で長期間保存することができます。凍結融解を繰り返すごとにウイルス力価は低下しますので少量ずつ分注して保存することをお勧めします。（Higashikawa, *et al*., 2001）

## VI. 組換えレンチウイルスの力価測定

### A. 各種力価測定方法

最適な多重感染度（MOI）を調べて再現性のある遺伝子導入（トランスダクション）結果を得るためには、調製したレンチウイルスストック液の力価を測定することが必要です。回収したばかりのレンチウイルスストック液を用いて力価を直ちに測定することもできますし、少量ずつ分注して－ 80℃で保存してから力価を測定することもできます。凍結融解を繰り返すたびにウイルスストック液の力価が 1/2 ～ 1/4 低下することに注意してください。力価の値は、細胞のタイプと使用する力価測定法に大きく依存します。さらに、力価測定に一般的に用いられる細胞（例えば HT-1080 細胞株）で求めた力価と最終的に遺伝子導入された標的細胞の数との間で、大きな差が出ることもあります。しかし力価測定は、種々のベクターから調製されたストック液の相対的なウイルス含量の決定のほか、以下のために重要です。

- ウイルスストック液の生存率の確認
- 最適な遺伝子導入条件の決定
- 遺伝子導入される細胞中のウイルスコピー数を制御するための MOI の調整
- ウイルスストック液によって感染させることができる細胞の最大数の決定

力価測定は、マーカーの存在やそのタイプに応じて、種々の方法で行うことができます。

- **qRT-PCR**
  Lenti-X qRT-PCR Titration Kit（製品コード 631235）を用いれば、 1 ステップ qRT-PCR と SYBR Green I を用いるプロトコールで上清中の RNA タイターを迅速に約 4 時間で測定することができます。この方法は、マーカーに関係なく、どのようなレンチウイルスベクターにも使用でき、種々のベクターの力価比較や、回収したばかりのウイルスストック液の力価測定に有用です。
- **p24 ELISA**
  Lenti-X p24 Rapid Titer Kit（製品コード 632200）は ELISA 法を用いてウイルス上清中の p24 キャプシドタンパク質の量を測定します。p24 の量はウイルス力価と相関します。本アッセイの所要時間は約 4 時間です。
- **フローサイトメトリー**
  蛍光タンパク質搭載のレンチウイルスベクターの場合、フローサイトメトリーにより蛍光値を測定することで、導入効率を測定することができます。
  この方法で測定したタイターは、通常、抗生物質選択により測定したタイターより高くなります。（B. フローサイトメーターを用いた生物学的力価測定法参照）
- **抗生物質選択**
  選択マーカーを含むレンチウイルスベクターの場合、ウイルスストック液の段階希釈系列を作製してそれぞれを細胞に感染させ、適切な抗生物質を用いて安定な遺伝子導入細胞を選択します。選択終了後に増殖する薬剤耐性コロニーの数から力価を計算します。

[ 備考 ] Lenti-X GoStix は、ウイルス上清 20 μl と Chase Buffer を GoStix に加えるだけの簡単な操作で、Test Band の有無により最短 30 秒（～ 10 分）でレンチウイルス力価を簡易判定できます。パッケージング細胞の培養上清からウイルスを回収するか培養を続けるかを判断する際に非常に便利です。

## B. フローサイトメーターを用いた生物学的力価測定法

生物学的力価の測定では、導入する遺伝子発現を検出してその力価を算出します。以下に蛍光タンパク質である AcGFP1 遺伝子を搭載した pLVSIN-AcGFP1-N1 Vector（製品コード 6187）と Lentiviral High Titer Packaging Mix、*Trans*IT-293 Transfection Reagent を使用して調製したレンチウイルスベクターの生物学的力価測定法を紹介します。

### B-1. HT-1080 細胞播種

HT-1080 細胞を 12 ウェル細胞培養用プレートに 2.5 × $10^4$ cells/1 ml/well で播種し、5% $CO_2$ インキュベーター内で 37℃にて培養する。
培地は 10% FBS 含有 DMEM 培地を使用する。1% Penicillin-Streptomycin を添加した DMEM 培地も使用できる。

### B-2. レンチウイルス感染（細胞播種翌日）

1. 10% FBS 含有 DMEM 培地にポリブレンを添加する。（培地 450 μl に対して 8 mg/ml ポリブレン溶液 0.5 μl）
2. B-1. にて播種した HT-1080 細胞の培地を 450 μl のポリブレン含有培地と交換する。
3. 調製したレンチウイルス液を 10% FBS 含有 DMEM で段階希釈する。希釈倍率はウイルス力価にもよるが、20 ～ 2,000 倍での段階希釈が望ましい。
4. 希釈したレンチウイルス液 50 μl を 2. の HT-1080 細胞に滴下し、感染させる。（ポリブレン終濃度 8 μg/ml、ウイルス最終希釈倍率 200 ～ 20,000 倍）
5. 5% $CO_2$ インキュベーター内で 37℃にて一晩培養する。

### B-3. 培地交換

1. 翌日にウイルス含有培地を 1 ml の 10% FBS 含有 DMEM に交換する。
2. 5% $CO_2$ インキュベーター内で 37℃にて二晩培養する。

### B-4. フローサイトメーターで評価

翌々日（感染から 3 日後）、細胞を Trypsin/EDTA で剥がして回収し、フローサイトメーターにて AcGFP1 陽性率を測定する。

### B-5. Viral biological titer の算出

得られた AcGFP1 陽性率を以下の式に当てはめて生物学的力価（IFU/ml）を算出する。計算に使用する AcGFP1 陽性率は 1.0 ～ 20.0% が望ましい。

Titer（IFU/ml）＝ 感染細胞数× AcGFP1 陽性率（%）／100 ×ウイルス希釈倍率／感染時液量（0.5 ml）

注：厳密に生物学的力価を算出したい場合は、HT-1080 細胞を播種する際にセルカウント用のウェルを作製することをお勧めします。レンチウイルスの感染日に HT-1080 細胞をセルカウントすることで感染時の正確な細胞数が得られます。

## VII. 組換えレンチウイルスを用いた標的細胞への遺伝子導入（トランスダクション）例

### VII-1. ポリブレン法

以下に示すプロトコールは、ポリブレンを用いて接着性細胞株（HT-1080、HeLa など）に遺伝子導入する一般的な方法です。標的細胞に対するポリブレンの最適濃度を実験的に求めて使用しますが、通常、2 ～ 12 μg/ml の濃度範囲に入ります。しかし、ポリブレンに過剰（24 時間よりも長く）にさらすと、細胞毒性が現れます。本プロトコールを参考に、使用する標的細胞への遺伝子導入最適条件を検討してください。遺伝子導入が困難な細胞あるいはポリブレンに弱い細胞の場合は、RetroNectin（Recombinant Human Fibronectin Fragment）（製品コード T100A/B）を用いると、遺伝子導入効率を著しく向上させることができます。（詳細は VII-2. をご参照ください。）

1. 遺伝子導入の前日に標的細胞を播種する。
2. 力価測定した少量のレンチウイルスストック液を融解する。あるいは、パッケージング細胞から調製した直後のウイルス液を用いる。融解したレンチウイルスを穏やかに混合する。

   注：ボルテックスで撹拌しないでください。また、凍結融解のたびに力価が減少するので注意が必要です。
3. レンチウイルス液とポリブレンを添加できるように、標的細胞の培地の容量を調整する。遺伝子導入の過程で目的の最終濃度（例えば 4 μg/ml）となるようにポリブレンを添加する。
4. 目的の多重感染度（MOI）が得られるように、レンチウイルス液を培地で希釈する。ウイルス力価が不明な場合は、レンチウイルス液の段階希釈系列を用いる。この場合、ウイルス液の全量が、遺伝子導入に用いる培地の最終容量の 1/3 以下となるようにする。
5. ウイルス上清を細胞に加え、8 ～ 24 時間、37℃、5% $CO_2$ インキュベーターで培養する。感染効率を向上させたい場合は、培養液を遠心後（プレートを 32℃で 1,200 × *g*、60 ～ 90 分遠心すると、感染率が著しく増大する。32℃が使えない場合は、室温遠心でもよい）、37℃、5% $CO_2$ インキュベーターで培養する。ポリブレンあるいはウイルス上清（パッケージング細胞によってコンディショニングされた培地を含む）に細胞を長くさらすことが心配な場合は、遺伝子導入の時間を 6 ～ 8 時間に短縮してもよい。
6. ウイルスを含む遺伝子導入培地（トランスダクション培地）を除去して、新しい培地を加える。

   注：廃棄する培地には感染能を持ったウイルスが含まれているので適切な処理を行ってください。
7. 十分な導入遺伝子発現が確認できるまで（通常、24 ～ 48 時間）、感染細胞を培養する。
8. 解析のために細胞を回収する。あるいは、適切な抗生物質を用いて選択を始める。

   注：遺伝子導入効率を求めるために、感染細胞の一部を抗生物質選択に供し、残りの細胞を回収して分析に用いることをお勧めします。

## VII-2. RBV-spin 法

### A. RetroNectin コートプレートの作製

1. RetroNectin 溶液を融解し均一になるように混合する（ボルテックスによる撹拌は避けてください）。使用時に滅菌済み PBS で適当な濃度（20 ～ 100 μg/ml）＊1 となるように希釈する。

   ＊1：フィルターに吸着する可能性があるため、希釈後の RetroNectin 溶液はフィルターろ過しない。

2. クリーンベンチ内で、0.25 ～ 0.5 ml/cm$^2$（プレート底面が溶液で浸る程度）となるように RetroNectin 希釈液をプレート＊2 に加えてプレート全底面に広げ、室温で 2 時間または 4℃で一晩放置する。24 ウェルプレートの場合には 1 ウェルあたり 0.5 ml、6 ウェルプレートの場合には 1 ウェルあたり 2 ml の RetroNectin 希釈液を加える。

   ＊2：プレートは必ずノントリートメントタイプのものを使用する。

3. RetroNectin 希釈液を除き、適当量の 2% BSA/PBS 溶液を加えてブロッキングを行う。室温で 30 分間放置する＊3。24 ウェルプレートの場合は 0.5 ml/well、6 ウェルプレートの場合は 2 ml/well のブロッキング液を加える。

   ＊3：すぐに使用する場合は、2% BSA/PBS 溶液によるブロッキング操作は省くことができる。この場合、ステップ 4 の PBS または HBSS/HEPES による洗浄を 2 回繰り返す。

4. 2% BSA/PBS 溶液を除き、適当量の PBS または HBSS/HEPES で一度洗浄し、それらを除去した後、プレートを保存する。このプレートを RetroNectin コートプレート＊4 とする。

   ＊4：2% BSA/PBS 溶液によるブロッキング操作を行った場合は、容器のふたをパラフィルムなどでシールし、4℃で 1 週間の保存が可能である。

### B. RetroNectin Bound Virus（RBV）-Spin 法（遠心感染）

注：マルチウェルプレートの場合、ウェル位置により導入率に差が生じることがある。できる限りプレート中央に近いウェルを使用することをお勧めします。

1. 目的遺伝子を持つ組換えウイルス液の原液、あるいは希釈液を RetroNectin コートプレート上に 125 ～ 250 μl/cm$^2$ となるように加える。

2. 32℃で 2,000 × *g*、2 時間の遠心を行い、RetroNectin へウイルス粒子を吸着させる。

3. プレート上が乾燥しないように注意しながら、ウイルス液を除去し、適当量の PBS または 0.1 ～ 2% のアルブミン（BSA や HSA）を含む PBS を添加する（溶液は細胞へのウイルス感染直前まで除かない）。

4. 標的細胞懸濁液を調製する。適切な細胞濃度は標的細胞の大きさや増殖率によって異なる。細胞に応じて、0.05 ～ 5 × 10$^5$ cells/cm$^2$ の範囲で検討する。

5. 3. で作製したウイルス結合プレートの溶液を除去し、速やかに細胞懸濁液を加える。標的細胞とウイルスベクターの接触を促す目的で、細胞添加後、遠心操作を行っても良い。例えば 500 × *g*、1 分間遠心など。

6. 37℃、5% $CO_2$ インキュベーターで培養する。

## VIII. トラブルシューティングガイド

| 問題 | 説明 | 解決策 |
|---|---|---|
| **A. ベクタークローニング** | | |
| 1. プラスミドの調製あるいはクローニングが困難 | 最適でない大腸菌宿主株で増幅させた場合、ある種のウイルスベクターは 5′ および 3′LTR の間で再構成（組換え）を受ける可能性がある。 | 高収率の DNA を得るため、および DNA の再構成（組換え）の可能性を最小限にするために、***E. coli*** **HST08 Premium Electro-Cells**（製品コード 9028）を用いる。 |
| **B. Lenti-X 293T 細胞** | | |
| 1. 融解時の生存率が低い | 融解方法が適切でない。 | IV. B の融解操作に従う。 |
| | 培地が適切でない。 | II. C に記載されている培地を用いる。 |
| | 組織培養用プラスチックプレートが適切でない。 | 最初の播種の際、細胞接着を促すために、コラーゲン 1 をコートしたプレートを用いる。 |
| 2. 増殖が遅い | 培地が適切でない。 | II. C に記載されている培地を用いる。 |
| 3. 細胞がプレートに接着しない | 組織培養用プラスチックプレートが適切でない。 | 最初の播種の際、細胞接着を促すために、コラーゲン 1 をコートしたプレートを用いる。 |
| 4. 細胞の形態が変わったように見える | 細胞の継代回数が多すぎる。 | 新たな Lenti-X 293T 細胞ストック液を融解する。あるいは新たに購入する。 |

| C. ウイルスの生産 | | |
|---|---|---|
| 1. トランスフェクション効率が低い（Lenti-X 293T 細胞株で目的遺伝子あるいはマーカー遺伝子を発現させてその効率を求めた場合） | 播種した細胞の密度が適切でない。 | *Trans*IT-293 Transfection Reagent の場合、5×$10^6$ cells/100 mm プレートになるように播種する。使用する遺伝子導入試薬によって最適な細胞密度が異なる（V. 参照）。 |
| | DNA 量が適切でない。 | V. に示す最適な条件を用いる。 |
| | DNA の品質が悪い。 | 吸光度 $A_{260/280}$ の値が 1.8 ～ 2.0 であること。エンドトキシンの含有率が高い。NucleoBond Xtra Midi/Maxi EF（製品コード 740420.10、740424.10 など）を用いてプラスミド調製を行う。 |
| | トランスフェクション後の細胞の回収あるいは解析の時期が早すぎる。 | 目的遺伝子またはマーカー遺伝子を最大に発現させるために、トランスフェクトの 48 時間後まで培養する。 |
| 2. 力値が低い（< $10^4$ IFU/ml） | トランスフェクション効率が低い。 | 本表の C. 1 参照。 |
| | ウイルスの回収時期が早すぎる。 | トランスフェクションの開始から 48 ～ 72 時間後にウイルスを回収する。 |
| | ベクターが大きすぎる（パッケージング機能の上限は 5′ LTR から 3′ LTR までの長さとして最大 9.7 kb である）。 | 大きなベクターの場合、ウイルスを濃縮する。あるいは、インサートのサイズを小さくする。 |
| | ポリブレンの入れ忘れか、濃度が最適になっていない。 | 遺伝子導入（トランスダクション）の過程でポリブレン（4 μg/ml）を加える。あるいは、濃度を最適化する（2 ～ 12 μg/ml）。 |
| | ウイルスストック液の凍結融解を何度も繰り返している。 | 凍結融解のたびにウイルス力価が約 1/4 ～ 1/2 減少する。凍結融解の回数を制限する。 |
| | 力価測定の過程で選択操作が最適でない。 | 力価測定に用いる前に、細胞株に対して抗生物質死滅曲線（antibiotic kill curve）を求めておく。 |

| D. 標的細胞への遺伝子導入（トランスダクション） | | |
|---|---|---|
| 1. 遺伝子導入効率が低い | ウイルス力価が低い。 | 本表の C. 2 参照。または、遠心してウイルスを濃縮する（Appendix 参照）。 |
| | 遺伝子導入の過程で標的細胞の生存率が低下した。 | 感染を行う前に、標的細胞の培養条件を最適化する。 |
| | | パッケージング細胞株によってコンディショニングされた培地が細胞増殖に悪影響を与えているかもしれない。ウイルス上清を希釈するか、ウイルス上清にさらす時間を短くする。RetroNectin と RetroNectin Bound Virus-Spin 法を試す。 |
| | | ポリブレンにさらし過ぎ。ポリブレンの量を最適化するか、ウイルス上清にさらす時間を短くする。 |
| | 遺伝子導入を阻害する物質がウイルス上清に含まれている。 | RetroNectin または RetroNectin-coated plate を用いて RetroNectin Bound Virus-Spin 法を試す。この方法では、ウイルス粒子が基質に結合し、標的細胞への感染の前に阻害物質が洗浄・除去される（VII-2. 参照）。 |
| 2. 目的遺伝子の発現が弱い | 遺伝子導入効率が低い。 | 本表の D. 1 参照。 |
| | 標的細胞の生存能が低い。 | 標的細胞の最適培養条件を検討する。 |
| 3. 感染が標的細胞に有害 | MOI が高すぎる（使用したウイルスの量が多すぎる）。 | ウイルスストック液を希釈する。ウイルス力価を測定する。 |
| | ポリブレンの毒性の影響。 | ポリブレンの濃度を下げる、あるいは最適化する。感染時間を短くする。 |
| | パッケージング細胞上清あるいは培地が細胞に有害。 | 標的細胞培養培地を用いてウイルスストック液を希釈する。標的細胞培養培地を用いてパッケージング細胞からウイルスを回収する。 |

## IX. 関連製品

レンチウイルスパッケージングシステム
- Lentiviral High Titer Packaging Mix（製品コード 6194）

パッケージング細胞
- Lenti-X™ 293T Cell Line（製品コード 632180）

力価測定
- Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit（製品コード 631235）
- Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit（製品コード 632200）
- Lenti-X™ GoStix™（製品コード 631243/631244/631241）

組換えレンチウイルスの精製
- Lenti-X™ Maxi Purification Kit（製品コード 631233/631234）

組換えレンチウイルスの濃縮
- Lenti-X™ Concentrator（製品コード 631231/631232）

組換えレンチウイルスの感染効率アップ
- RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)（製品コード T100A/B）
- RetroNectin® Dish（RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mm$\varphi$）（製品コード T110A）

## X. 参考文献


- Cochrane, A. W., Chen, C. H., and Rosen C. A. (1990) Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**:1198-1202.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E., eds. (1997) Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY).
- Higashikawa, F. and Chang L. (2001) Kinetic Analysis of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology.* **280**:124-131.
- Higashimoto, T., Urbinati, F., Perumbeti, A., Jiang, G., Zarzuela, A., Chang, L-J., Kohn, D. B., and Malik, P. (2007) The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element reduces readthrough transcription from retroviral vectors. *Gene Ther*. **14**(17): 1298-1304.
- Improve Viral Transductions with RetroNectin® Reagent (October 2008) *Clontechniques.* (2008 年冬号 ):11-12.
- Kozak, M. (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*. **196**:947-950.
- Lenti-X™ 293T Cells for Superior Lentivirus Packaging (October 2008) *Clontechniques.* (2008 年冬号 ):10.
- Quinn, T. P. and Trevor, K. T. (1997) Rapid quantitation of recombinant retrovirus produced by packaging cell clones. *Biotechniques.* **23**:1038-1044.
- Rapid Lentiviral and Retroviral Titration Kits (January 2008) *Clontechniques*. (2008 年早春号 ):19-21.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell.* **101**:173-185.
- Zufferey, R., Donello, Trono, D., and Hope, T. J. (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol*. **73**:2886-2892.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E., eds. (1997) Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY).
- Freshney, R. I. (2005) Culture of Animal Cells, 5th Edition (Wiley-Liss, NY).
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingdom, R. E., Moore, D. M., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, NY).

## Appendix：補足のプロトコール

### 1. 安定な細胞株を選択するための抗生物質の力価測定

LVSIN レンチウイルスで遺伝子導入した細胞を、抗生物質 G418（製品コード 631308）、Hygromycin B（製品コード 631309）、Puromycin（製品コード 631306）を用いて選択する前に、各選択抗生物質の力価を測定して標的細胞株に対する最適濃度を求めておく必要があります。

**表 1. 選択抗生物質の推奨濃度（μg/ml）**

| 抗生物質 | ワーキングレンジ | 選択 | 維持 |
|---|---|---|---|
| G418 | 50 ～ 800 | 400 ～ 500 | 100 |
| Hygromycin | 50 ～ 800 | 200 | 100 |
| Puromycin | 0.25 ～ 2 | 0.5 ～ 10 | 0.25 |

- G418 および Hygromycin B で安定な形質転換体を選択する場合、約 5 日で細胞の多くが死滅し 2 週間以内にすべての細胞が死滅する最小濃度を使用します。
- Puromycin 選択はより速く起こります。3 ～ 4 日以内にすべての細胞が死滅する濃度を使用します。
- すべての選択抗生物質において力価はロット間で変動しますので、新たなロットの抗生物質を使うたびに力価を測定する必要があります。

1. 各抗生物質の力価を測定するために、各濃度の G418 あるいは Hygromycin B（0, 50, 100, 200, 400, 800 μg/ml）を添加した 3 ml の完全培地を含む 6 ウェルプレートの各ウェルに、$2 \times 10^5$ 個の細胞を播種する。Puromycin の場合は、濃度がそれぞれ 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 μg/ml となるよう培地に添加する。
2. G418 および Hygromycin B の場合は、5 ～ 10 日間あるいはすべての細胞が死滅するまで細胞を培養する。2 日ごとにディッシュを観察し、細胞が生存しているかどうか調べる。4 日ごとに（必要であれば、さらに頻繁に）選択培地を交換する。最適濃度が決まるまで、その操作を続ける。
3. Puromycin の場合は、4 ～ 7 日間細胞を培養する。2 日後に培地を交換し、死滅した細胞を除去する。

### 2. ウイルスの濃縮

Lenti-X Concentrator（製品コード 631231）は、超遠心を行わずに、レンチウイルスストック液を簡単、迅速かつ効率的に濃縮することができる安価な試薬です。レンチウイルス上清に Lenti-X Concentrator を混合し（上清が 30 ml の場合、Concentrator を 1/3 量の 10 ml 使用）、短時間インキュベート（4℃で 30 分～ O/N）した後、通常の遠心機で 1,500 × *g*、4℃で 45 分間遠心するだけです。上清を除いた後のペレットを 1/10 ～ 1/100 量の PBS などに再懸濁することで、10 ～ 100 倍の濃縮が可能です。

## XI. 使用上の注意

- 本製品の使用には遺伝子工学と細胞培養に関する基本的な技術が必要です。
- 本製品の使用には文部科学省の定める省令（「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号）にある P2 レベル以上の施設が必要です。詳しくは 4 ページ、「バイオセーフティーについて」を参照してください。
- 本レンチウイルスベクターの系によって生産されるウイルス上清は、挿入断片によっては危険なウイルスを含む恐れがあるため、組換えレンチウイルスの生産と取扱いには、適切な処置をとる必要があります。吸入や付着を防ぐため、必ず、安全キャビネットを使用してください。
- 本製品の使用はすべて研究用に限定されています。臨床目的での使用および生体外診断に使用することはできません。
- 本製品ご利用の際は省令および組織内の組換え DNA 安全委員会の指示に従い、安全には十分ご注意ください。
- 本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承の上ご使用ください。
- 本製品を工業的に使用される場合は、個別にライセンス契約の締結が必要です。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- RetroNectin はタカラバイオ株式会社の、In-Fusion は Clontech Laboratories, Inc. の、SYBR は Life Technologies Corporation の登録商標です。Lenti-X、CalPhos、GoStix は Clontech Laboratories, Inc. の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999　Fax 077-565-6995
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201509Da